

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_  
подпись                      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

Влияние низкоинтенсивного радиационного излучения на спектрально-  
люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина

03.04.02 Физика  
03.04.02.01 Биофизика

Научный руководитель	_____	в.н.с., д.ф.-м.н.	Н.С. Кудряшева
	подпись, дата		
Выпускник	_____		А.А. Луконина
подпись, дата			
Рецензент	_____	с.н.с., к.б.н.	Т.В. Рожко
подпись, дата			

Красноярск 2018

## РЕФЕРАТ

Магистерская работа по теме «Влияние низкоинтенсивного радиационного излучения на спектрально-люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина» содержит 48 страниц текстового документа, 62 использованных источника, 10 рисунков, 1 таблицу.

ФОТОПРОТЕИН ОБЕЛИН, ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ, ЦЕЛЕНТЕРАМИД,  $\text{Ca}^{2+}$ -РАЗРЯЖЕННЫЙ ОБЕЛИН, СПЕКТРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ, ПЕРЕНОС ПРОТОНА.

Объект исследования – фотопротейн обелин.

Работа посвящена исследованию зависимости спектральных характеристик фотолюминесценции целентерамид-содержащего флуоресцентного белка при воздействии низкодозовой радиации бета и гамма типов. В качестве представителя группы целентерамид-содержащих белков выбран  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный фотопротейн обелин; в качестве излучателей бета и гамма типа выбраны тритий и радиоизотоп цезия (H-3 и Cs-137), соответственно. . Изучение влияния низкодозового ионизирующего излучения на флуоресцентные характеристики разряженного обелина актуально с точки зрения выявления элементарных физико-химических и молекулярных механизмов откликов организмов на стрессовые воздействия. С прикладной точки зрения, эти исследования формируют базу для использования разряженного обелина в качестве принципиально нового биотеста с цветовой регистрацией радиационных эффектов.

Изучено хроническое влияние низкодозового гамма излучения на интенсивность и спектральный состав фотолюминесценции разряженного при 5°C и 20°C и фотовозбуждении 350 нм. Спектры фотолюминесценции были разложены на гауссовы компоненты, соответствующие различным излучателям. Проведено соотнесение выделенных компонент спектра испускания различным формам целентерамида (протонированной, частично протонированной и фенолят-пиразин аниона). По соотношению вкладов

компонентв спектр испускания, установлено, что эффективность переноса протона под действием цезия во флуорофоре разряженного обелина падает при увеличении времени воздействия гамма-излучения. Продемонстрирована чувствительность разряженного препарата к никодозовому облучению (до 100мГр); в качестве биотестовых параметров предложено использовать два флуоресцентных параметра: интенсивность флуоресценции и соотношение вкладов фиолетовой и сине-зеленой компонент. Проанализированы спектральные характеристики флуоресценции разряженного обелина при импульсном возбуждении с временным разрешением под воздействием трития. Показано, что  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный обелин в возбужденном состоянии образует эмиттеры разного типа, а также показано, что фиолетовая компонента имеет короткое время жизни и вклад этой компоненты растет в присутствии трития, в то время как сине-зеленые компоненты соответствуют длинному времени жизни и их вклад уменьшается в присутствии трития.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 ЛИТЕРАТУРНАЯ ЧАСТЬ.....	8
1.1. Биолюминесцентная реакция и структура фотопротейна обелина.....	8
1.2. Флуоресцентные формы целентерамида.....	10
1.3. Свойства и поведение трития и цезия в окружающей среде.....	13
1.3.1. Характеристики гамма- и бета-частиц.....	13
1.3.2. Процессы в водных растворах при воздействии ионизирующего излучения.....	14
1.3.3. Распад трития его поведение в окружающей среде.....	16
1.4. Радиобиологические эффекты.....	17
1.4.1. Гормезис.....	17
1.4.2. Радиобиологические эффекты бета-излучения.....	18
1.4.3. Радиобиологические эффекты гамма-излучения.....	19
Глава 2. Экспериментальная часть.....	21
2.1. Рабочие растворы и реактивы.....	21
2.2. Схема эксперимента.....	21
2.3. Используемая аппаратура.....	22
2.4. Математическая обработка.....	23
<b>Глава 3. Результаты и обсуждения.....</b>	<b>25</b>
3.1. Анализ спектров $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина под воздействием $\gamma$ -излучения.....	25
3.2. Анализ вкладов компонент в спектр $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина при воздействии $\gamma$ -излучения.....	28
3.3. Анализ спектров $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина под воздействием $\beta$ -излучения.....	35
3.4. Анализ спектральных компонент $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина.....	35
ВЫВОДЫ.....	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	41

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все больше территорий характеризуется повышенным радиационным фоном вследствие утечки радиоактивных продуктов из мест захоронения [1]. Живые организмы, обитающие на таких территориях, подвергаются дополнительному низко - и среднетдозовому облучению. Поэтому актуальным является изучение эффектов и механизмов воздействия низко - и среднетдозового радиационного облучения на организмы. В последние годы активно исследуется низкодозовое радиационное воздействие на организмы, ткани, клетки [2, 3, 4, 5, 6] и ферментативные системы [7, 8, 9].

Существует возможность оценки радиационных эффектов на уровне элементарных физико-химических процессов (т.е. переноса энергии, электрона, протона) в биологических системах. Для этого могут быть использованы «голубые флуоресцентные белки», т.е. флуоресцентные целентерамид-содержащие белки, продукты биолуминесцентных реакций кишечнораостных. В качестве примера выбран представитель группы целентерамид-содержащих флуоресцентных белков – разряженный обелин, продукт биолуминесцентной реакции гидроидного полипа *Obelia longissima*. Препарат разряженного обелина обладает рядом преимуществ, таких как стабильность, нетоксичность и высокий квантовый выход флуоресценции [10].

К настоящему времени детально изучены закономерности изменения интенсивности и цвета люминесценции разряженного фотопротеина обелина под действием нерадиоактивных внешних физических воздействий и экзогенных соединений, что создает предпосылки для понимания результатов воздействия ионизирующего излучения [11, 12]. Изучение влияния низкодозового ионизирующего излучения на флуоресцентные характеристики разряженного обелина актуально с точки зрения выявления элементарных физико-химических и молекулярных механизмов откликов организмов на стрессовые воздействия. С прикладной точки зрения, эти исследования формируют теоретическую базу для использования разряженного обелина в

качестве принципиально нового биотеста с цветовой регистрацией радиационных эффектов. Возможность такой регистрации основана на связи структуры белков с эффективностью элементарного фотохимического процесса, т.е. переносом протона в электронно-возбужденном состоянии флуорофора белка (целентерамида).

В качестве источника бета-излучения был выбран тритий, изотоп водорода, который является одним из самых распространенных продуктов распада радиоизотопов, использующихся в ядерной промышленности [1]. Благодаря низкой энергии бета-распада, тритий является удобным объектом для изучения адаптивных реакций организма в условиях низких и средних доз облучения.

В качестве источника  $\gamma$ -излучения выбраны цезий-содержащие частицы ( $^{137}\text{Cs}$ ) или «горячие» частицы, которые были обнаружены в пойме реки Енисей. [13,14].

Цель данной работы – выявление закономерностей влияния низкодозового  $\beta$ - и  $\gamma$ -излучения на спектральные характеристики фотолюминесценции обелина.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Зарегистрировать изменение спектров фотолюминесценции обелина под воздействием хронического  $\gamma$ -излучения цезиевых частиц в условиях стационарного фотовозбуждения; сравнить с эффектами  $\beta$ -излучения
2. Выявить чувствительность флуоресцентных характеристик (интенсивности и вкладов спектральных компонент фотолюминесценции) разряженного обелина к  $\gamma$ -излучению;
3. Связать изменение спектров фотолюминесценции разряженного обелина с эффективностью переноса протона во флуорофоре флуоресцентного белка под влиянием излучения цезия-137.
4. С использованием флуоресцентной спектроскопии с наносекундным разрешением и импульсным возбуждением выявить количество спектральных компонент в спектрах флуоресценции разряженного обелина,

их времена жизни, а также кинетику изменения их вкладов при хроническом воздействии трития.

## Глава 1 ЛИТЕРАТУРНАЯ ЧАСТЬ

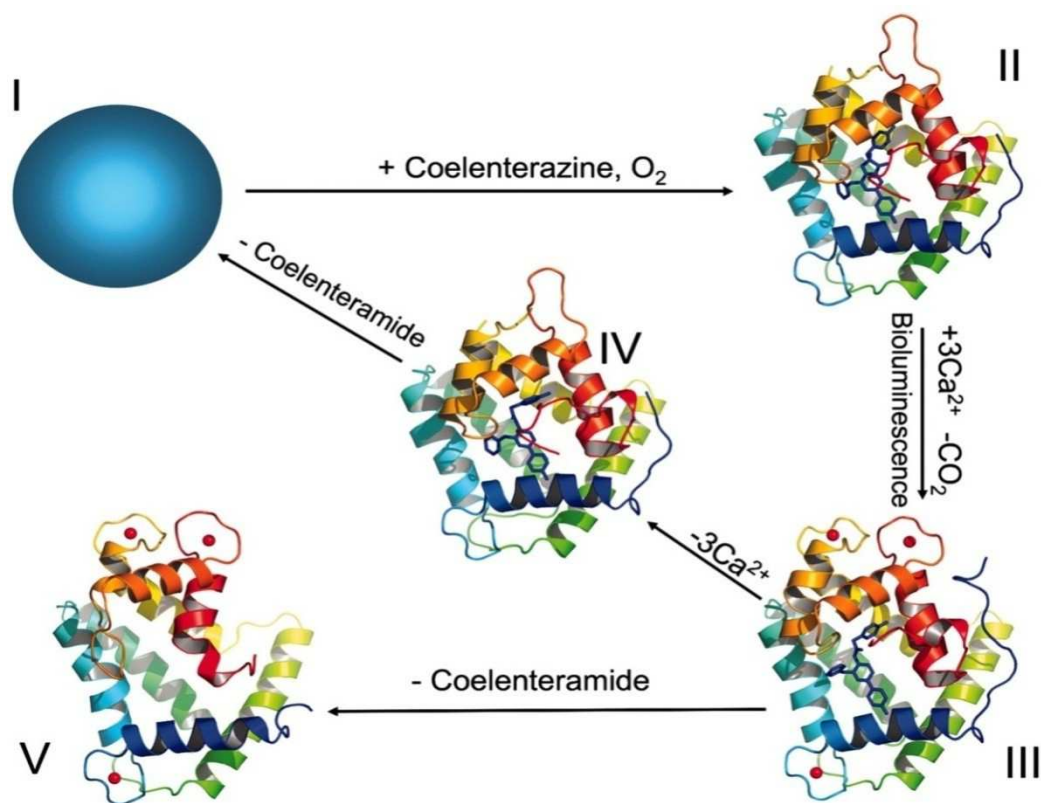
### 1.1. Биolumинесцентная реакция и структура фотопротеина обелина

В 1966 году был впервые предложен термин «фотопротеин» как удобное общее определение белков, биolumинесцентная реакция которых выходит за рамки классической концепции взаимодействия между компонентами биolumинесцентных реакций [15]. Фотопротеины отличаются от люцифераз тем, что им не требуется внешних субстратов, включая кислород, для биolumинесцентной активности. Вся энергия, аккумулированная в «заряженном» фотопротеине, излучается в ходе реакции. Фотопротеины не могут совершать несколько актов реакции, как обычный фермент [16].

Обелин – представитель семейства фотопротеинов, ответственный за биolumинесценцию морского кишечнополостного *Obelia Longissima*.

Фотопротеин обелин представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из апопротеина – односубъединичного полипептида (~22 кДа) (I, рисунок 1) и «преактивированного» кислородом субстрата – 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком внутри гидрофобной полости [17]. При связывании ионов кальция фотопротеин подвергается конформационному изменению, инициирующему реакцию внутримолекулярного окислительного декарбоксилирования связанного с белком субстрата. В результате образуются продукт реакции, целентерамид, в возбужденном состоянии и  $\text{CO}_2$ . Целентерамид является флуорофором, и его переход из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением кванта видимого света [18]. Продукт биolumинесцентной реакции – комплекс апопротеина с целентерамидом – принято называть разряженным фотопротеином (III, рисунок 1) [19]. Поскольку комплекс целентерамида с белком характеризуется голубой флуоресценцией, он был назван также «голубым флуоресцентным белком» [20].





I - полипептид; II - фотопротейн; III – разряженный фотопротейн; IV – фотопротейн без ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ; V – полипептид, связанный с ионами  $\text{Ca}^{2+}$

Рисунок 1 - Общая схема биолюминесцентной реакции фотопротейнов

В настоящее время используют рекомбинантные фотопротейны полученные генно-инженерными методами: кДНК фотопротейна клонируется и экспрессируется в клетках *E.coli* [21]. Полученный таким образом белок эффективно превращается в фотопротейн инкубированием с синтетическим субстратом – целентеразином – и кислородом в буферном растворе в присутствии восстановителей [22].

Фотопротейны (комплексы апопротеина с 2-гидропероксицелентеразином) не флуоресцируют при фотовозбуждении, однако продукт биолюминесцентной реакции, разряженный фотопротейн, (комплекс апопротеина с целентерамидом) характеризуется эффективной флуоресценцией. Фотолуминесценция  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина сдвинута по сравнению с биолюминесценцией в длинноволновую область и наблюдается при 510 нм [23].

## 1.2. Флуоресцентные формы целентерамида

Целентеразин – это соединение, способное участвовать в хемилюминесцентных реакциях и широко распространенное в светящихся морских организмах. Хемилюминесцентная реакция целентеразина завершается образованием целентерамида и испусканием кванта света [24].

Изучение флуоресценции целентерамида и его аналогов в четырех различных растворителях (ДМСО, ацетонитрил, бензол и н-бутанол) [24] показало, что целентерамид может образовывать четыре различные флуоресцентные формы, таких как протонированная форма, амид анион, комплекс с частичным переносом протона, резонансная структура фенолят-пиразин-N(4) анион (рис. 2)

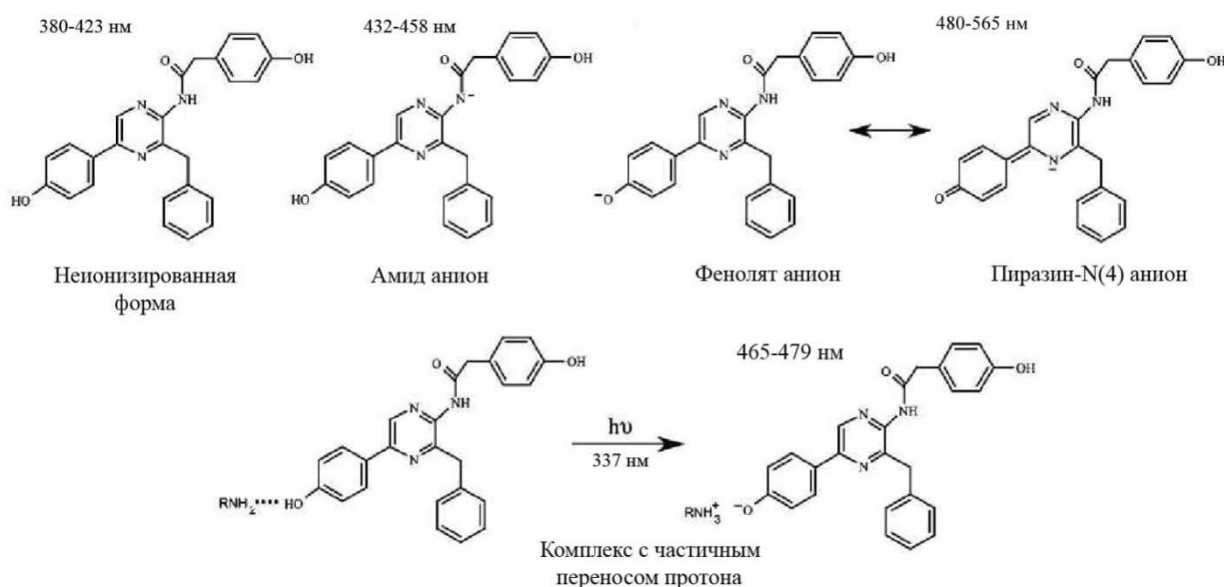


Рисунок 2 – Флуоресцентные формы целентерамида

Эти флуоресцентные формы излучают и при биолюминесценции фотопротеинов, и при фотолуминесценции продуктов их биолюминесцентных реакций – разряженных фотопротеинов [25].

Ионизированная (депротонированная) форма ЦЛМ образуется из неионизированной (протонированной) в результате фотохимического процесса переноса протона во флуоресцентном состоянии. На рисунке 3 схематично показаны различные флуоресцентные состояния энергий

протонированной и депротонированной форм ЦЛМ [26]. Флуоресцентные формы ЦЛМ различаются энергий флуоресцентных состояний, а, следовательно, и цветом люминесценции.

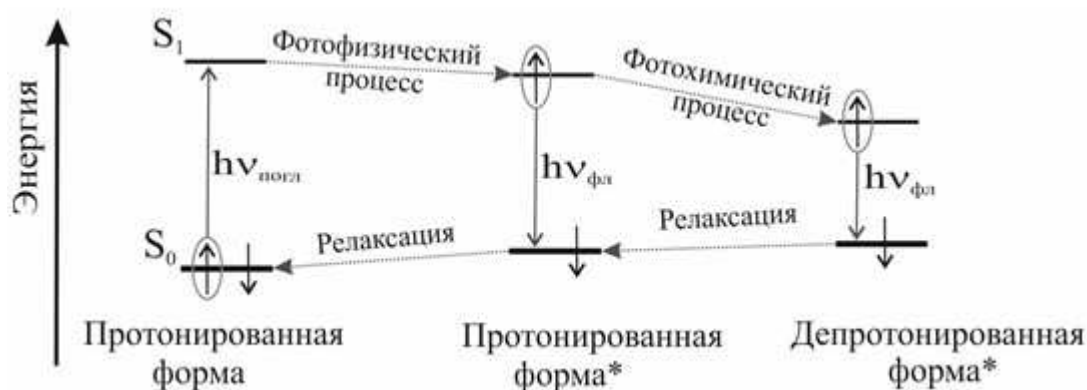


Рисунок 3 – Схема фотофизических и фотохимических процессов, инициирующих образование флуоресцентных состояний целентерамида в разряженном обелине [26].

В разряженных фотопротеинах ЦЛМ связан с полипептидом (апобелком), что усложняет понимание механизма образования эмиттеров биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов.

При изучении модельных хемилюминесцентных реакций в растворах амид анион был идентифицирован как первичное возбужденное состояние [27]. Далее Хори с коллегами [28] провели исследования хемилюминесцентных свойств ряда аналогов целентеразина. На основании спектрального сходства флуоресценции амид аниона и биолюминесценции акворина сделан вывод о том, что амид анион является эмиттером биолюминесценции акворина. В работе профессора Шимомура [24] также предполагалось, что эмиттером флуоресценции акворина, помимо протонированной формы ЦЛМ, может быть амид анион, максимум флуоресценции которого наблюдается при 435-458 нм.

Однако следует отметить, что в случае биолюминесценции и фотолюминесценции фотопротеинов, в отличие от модельных экспериментов с ЦЛМ и его аналогами, флуорофор находится в окружении аминокислотных

остатков и взаимодействует с ними через систему водородных связей. В этих условиях весьма вероятен перенос протона, который будет менять структуру молекулы излучателя.

В дальнейших работах в качестве эмиттеров люминесценции фотопротеинов были предложены протонированная форма ЦЛМ и фенолят анион. Хирано и его коллеги, изучая флуоресценцию аналогов целентерамида [29] предположили, что, эмиттером биолюминесценции акворина является фенолят анион, а не амид анион, как считалось ранее. В других работах [30, 31] также подтверждается, что амид анион не может претендовать на роль эмиттера люминесценции фотопротеинов.

В работе Томилина [32] показано, что спектр биолюминесценции обелина определяется положением протона между атомом кислорода фенольного фрагмента ЦЛМ и атомом азота His22. Затем, в работе Антипиной [33] с помощью квантово-химических методов показано, что спектр фотолюминесценции обелина зависит от положения протона между ЦЛМ и His22, в связи с этим на роль эмиттера предложено ион-парное состояние фенолят аниона ЦЛМ (комплекс с переносом протона).

Позднее были проведены эксперименты с использованием спектроскопии с временным разрешением по изучению флуоресцентных свойств спектральных компонент фотолюминесценции разряженных фотопротеинов: обелина и акворина [34]. На рисунке 4 представлены кривые затухания флуоресценции разряженных фотопротеинов, зарегистрированные на различных длинах волн. Из рисунка видно, что спады флуоресценции описываются несколькими экспонентами и зависят от регистрации длины волны, в случае обелина видно, что данный белок более стабильный и спад его флуоресценции меньше, по сравнению с акворином. В этой работе установлено, что при пикосекундном разрешении во флуоресценции разряженных фотопротеинов акворина и обелина наблюдаются две компоненты: одна с более высокой энергией ( $\sim 25000 \text{ см}^{-1}$ ), соответствующая протонированной форме ЦЛМ, и вторая с более низкой энергией –  $19400 \text{ см}^{-1}$  для обелина и  $21300 \text{ см}^{-1}$  для акворина. Время жизни ( $t_{1/2}$ )

флуоресцентных форм для второй компоненты составляет 4 нс в обоих случаях, а для первой компоненты  $\sim 2$  пс для разряженного обелина и 30 пс для разряженного акворина.

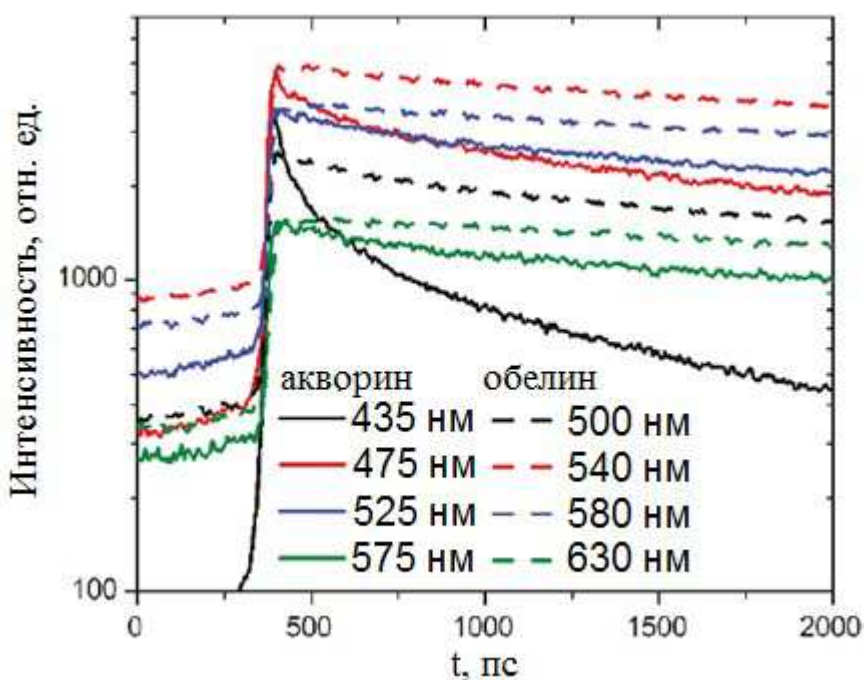


Рисунок 4 – Кривые затухания флуоресценции разряженных фотопротеинов: акворина (сплошная линия) и обелина (пунктирная линия), зарегистрированные на различных длинах волн [34].

### 1.3. Свойства и поведение трития и цезия в окружающей среде

#### 1.3.1. Характеристики гамма- и бета-частиц

Бета-частицы представляют собой поток электронов или позитронов, возникающих при радиоактивном распаде, обладающих большей проникающей (из-за меньшей массы и заряда) и меньшей ионизирующей способностью, чем альфа-частицы: на 1 см пробега бета-частиц в среде образуется несколько десятков пар заряженных ионов. Скорость бета- частиц обычно составляет 0,3 – 0,99 скорости света. При средних энергиях пробег бета-частиц в воздухе составляет приблизительно 1800 см, в воде – 1-2 см, в тканях человека – около 1 см, в металлах – 1 мм. . [35]

Все виды радиоактивного распада сопровождаются гамма-излучением. Гамма-излучение представляет собой поток квантов энергии, распространяющихся со скоростью света. Высокая энергия (0,01– 3 МэВ) и малая длина волны (менее 0,01 нм) обуславливают большую проникающую способность гамма-излучения. [36]

### **1.3.2. Процессы в водных растворах при воздействии ионизирующего излучения**

Первичной мишенью ионизирующего излучения могут стать как молекулы воды, так и высокомолекулярные соединения (белки, липиды, ферменты, нуклеиновые кислоты, молекулы сложных белков — нуклеопротеидные комплексы, липопротеиды).

Энергия частиц ионизирующего излучения превышает энергию внутримолекулярных и внутриатомных связей. Поглощаясь, она может мигрировать по молекуле, реализуясь в наиболее уязвимых местах. Результатом являются ионизация, возбуждение, разрыв наименее прочных связей, отрыв радикалов, называемых свободными. Это прямое действие радиации.

Важнейшим среди всех первичных радиохимических превращений является ионизация молекул воды (радиолиз воды), основного растворителя в биологических средах и составляющей 65-70% от массы большинства организмов.

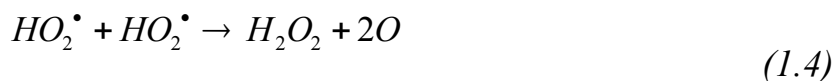
В результате действия ионизирующего излучения молекула воды ионизируется, теряя электрон:



Ион-радикал  $H_2O^+$  способен реагировать с нейтральной молекулой воды с образованием высокореактивного радикала  $OH^\bullet$ :



При наличии кислорода образуются окислительные продукты радиолиза воды: гипероксидный радикал ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), атомарный кислород ( $\text{O}$ ):



В результате радиолиза образуются также восстановительные продукты – это гидратированный электрон и атомарный водород. Гидратированный электрон ( $e_{aq}^-$ ) – стабилизированная форма электрона – обладает высокой восстановительной способностью.

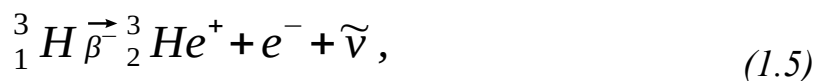
Свободные радикалы, образованные в результате радиолиза воды, характеризуются чрезвычайно высокой реакционной способностью; время их существования составляет от  $10^{-10}$  до долей секунды. В веществе радикалы либо рекомбинируют друг с другом, либо реагируют с окружающими молекулами: водой и органическими соединениями. Цель радикала – освободиться от неспаренного электрона путем передачи его другой молекуле или образования электронной пары, в результате чего образуется стабильная молекула. В частности, радикалы  $\text{OH}^\bullet$  ответственны более чем за половину радиационных повреждений молекул ДНК, так как они могут диффундировать на расстояние около 1 нм (это примерный радиус молекулы ДНК) [37].

Продукты радиолиза воды обладают очень высокой биохимической активностью и способны вызвать реакцию окисления по любым связям, в том числе и устойчивым при обычных окислительно-восстановительных превращениях. Следующие друг за другом химические и биохимические реакции могут быстро нарастать, приобретая характер цепных разветвленных реакций. Действие ионизирующего излучения, обусловленное продуктами радиолиза воды, называется непрямым действием радиации.

### 1.3.3. Распад трития его поведение в окружающей среде

Тритий ( $^3\text{H}$ ) — радиоактивный изотоп водорода. В малых количествах он всегда присутствует в окружающей среде, в основном в виде тритиевой воды (НТО), так как постоянно образуется под действием космического излучения в верхних слоях атмосферы. До начала ядерной эры концентрация  $^3\text{H}$  в природной воде была достаточно низкой — один атом  $^3\text{H}$  на  $10^{18}$  атомов протия ( $^1\text{H}$ ). Однако после проведения испытаний термоядерного оружия в атмосфере (конец 50-ых — начало 60-ых годов XX века) концентрация  $^3\text{H}$  повысилась почти в 1000 раз. И хотя после прекращения наземных испытаний в результате распада концентрация  $^3\text{H}$  снижалась, последние годы наблюдается локальное увеличение содержания  $^3\text{H}$  в окружающей среде как результат работы атомных электростанций [2, 38, 39].

В процессе распада  $^3\text{H}$  превращается в  $^3\text{He}^+$  с испусканием электрона и антинейтрино.



Период его полураспада 12,32 года. Доступная энергия распада мала (18,59 кэВ). Максимальный пробег бета-частиц трития в воздухе 5,8 мм при 20°C, в биологической ткани — 6,5 мкм. Бета-частицы трития полностью поглощаются роговыми слоями кожи, так что внешнее облучение организма тритием и его соединениями не представляет опасности. Наиболее опасно попадание в организм через кожу, лёгкие или при приеме пищи и воды. Являясь изотопом водорода, тритий химически ведет себя так же, как и протий, и поэтому способен замещать его во всех соединениях с кислородом, серой, азотом, легко проникая в протоплазму любой клетки. В этом случае испускаемое тритием бета-излучение способно серьезно повредить генетический аппарат клеток [39, 40].

Важную роль в физико-химических процессах, сопровождающих распад трития, играет перераспределение электронной плотности в среде. При распаде трития возникает бета-частица и положительно заряженный ион гелия-3 ( $^3\text{He}^+$ ).



Последняя частица чрезвычайно активна, она склонна к акцептированию электрона из окружающей среды (например, ближайшей органической молекулы) с образованием устойчивой оболочки инертного газа. При этом инициируется карбокатион, который способен вступать в различные химические реакции аналогично тому, как это рассматривается в работе [41] на примере меченного тритием бензола. Подобным же образом продукты бета-распада трития (электрон и  $^3\text{He}^+$ ) способны запускать (или активизировать) цепи переноса заряда/электрона в биохимических процессах. В результате описанных процессов, локальное воздействие при распаде трития может быть достаточно эффективным. Таким образом, изучение биологических эффектов бета-излучения  $^3\text{H}$  является одной из актуальных задач современной биофизики и радиобиологии и имеет большое практическое значение для безопасного развития атомной индустрии [42].

## **1.4. Радиобиологические эффекты**

### **1.4.1. Гормезис**

В радиобиологии существуют два направления, спор между которыми уже несколько десятилетий никак не закончится чьей-либо победой. Причина – разные подходы к оценке влияния на биоту малых доз радиации. Первый подход постулирует, что проблемы малых доз не существует и все закономерности больших доз можно экстраполировать на малые – линейная беспороговая гипотеза [43]. Второй подход – малые дозы по эффекту принципиально отличаются от больших, поэтому методология их изучения должна отличаться от общепринятой в современной радиобиологии. Предлагается гипотеза нелинейности зависимости доза-эффект [44].

Понятие «радиационный гормезис» было введено в биологию в 80-е годы; оно постулировало, что, если большие дозы радиации оказывают неблагоприятные эффекты на живые организмы – угнетают деление клеток,

рост и развитие, то малые дозы способны стимулировать различные физиологические процессы [45, 46, 47].

Естественный радиационный фон – не только один из важнейших факторов эволюции живого на Земле, но и необходимое условие существования биологических объектов. Существует физиологический уровень воздействия излучений, благоприятный для жизнедеятельности. Если культуру парameций [43, 44] изолировать от радиационных воздействий в свинцовом контейнере, в ней резко замедляется процесс деления клеток. После помещения в контейнер с культурой радиоактивного источника, воспроизводящего фоновый уровень радиации, митотическая активность нормализуется.

Сторонники идеи радиационного гормезиса не без оснований считают, что атомная радиация является естественным, постоянно действующим на организм фактором, без которого нормальное существование невозможно.

#### **1.4.2. Радиобиологические эффекты бета-излучения**

Ранее было изучены радиобиологические эффекты на примере биолюминесцентных бактерии, которые были использованы для мониторинга токсичности альфа-излучающего [8, 50, 51] и бета-излучающего [9] радионуклидов.

В статье [52] сравниваются эффекты америция-241 ( $^{241}\text{Am}$ ), альфа-излучающего радионуклида высокой удельной активностью и трития ( $^3\text{H}$ ), бета-излучающего радионуклида, на светящиеся бактерии *Photobacterium phosphoreum* в условиях низких доз облучения. Интенсивность биолюминесценции служит маркером физиологической активности бактерий. Были обнаружены три последовательные стадии реакции биолюминесценции на  $^{241}\text{Am}$  и  $^3\text{H}$ : (1) отсутствие эффекта, (2) активация, и (3) ингибирование. Они были интерпретированы с точки зрения реакции организма на стресс, т.е. распознавание стресса, адаптивный ответ и подавление физиологической функции. Так как термин "токсичность" определяется как подавление

биологической функции организмов, третий этап можно отнести к радиационной токсичности.

Также в статье Рожко [4] показано влияние трития с низкой активностью на биолюминесценцию бактерий *Photobacterium phosphoreum*. В течении 15 суток было выделено два периода: период задержки и активация биолюминесценции. Нелинейность зависимости интенсивности биолюминесценции от времени хронического воздействия трития на биолюминесцентные бактерии позволяет рассматривать данный эффект в терминах радиационного гормезиса. Стоит отметить, что за период наблюдения не было выявлено мутаций в бактериальной ДНК[53].

Таким образом, тритий является удобным объектом для изучения защитных реакций организма в условиях низких и средних доз облучения, благодаря низкой энергии бета-распада. Понимание молекулярных механизмов активации и подавления физиологических функций организмов в таких условиях чрезвычайно актуально в настоящее время.

#### **1.4.3. Радиобиологические эффекты гамма-излучения**

Биологические эффекты высокодозных гамма-облучений (1-200 Гр) были протестированы ранее с использованием бактериального люминесцентного анализа на основе рекомбинантной *Escherichia coli* [54]. Отклик светящихся морских бактерий на низко-дозовое гамма-излучение радионуклида  $^{137}\text{Cs}$  ( $\leq 0,25$  Гр), входящего в состав радиоактивных частиц, был исследован в работе [55]. Анализ последовательности Гена 16s рибосомной РНК бактерии не обнаружил мутагенных эффектов гамма-излучения в условиях эксперимента [53]. Однако установлено, что низкодозовое гамма-излучение [56] индуцирует SOS-хромотестовую реакцию *Escherichiacoli* и увеличивает частоту мутаций в клетках *Salmonellatyphimurium*.

Также было показано, что росттемпературы увеличил чувствительность бактериального биотеста к низкоинтенсивному гамма-излучению [55]. В

статье описаны эффекты при 5°C, 10°C и 20°C. Чувствительность воздействия на 5 и 10°C была очень низка, в то время как при 20° продемонстрирована высокая чувствительность к гамма-лучам. Эффект был связан авторами с интенсификацией метаболических клеточных процессов при более высокой температуре.

Ферментативные люминесцентные биотесты еще не использовались для мониторинга токсичности низкодозного гамма-излучения. Ферментативный биотест на основе бактериальной люциферазы не соответствует условиям хронического воздействия в экспериментах с низкодозовым излучением из-за относительно короткого времени регистрации биолюминесцентного сигнала (неопубликованные данные). Флуоресцентные целентерамид-содержащие белки могут быть использованы в качестве белкового флуоресцентного биомаркера для сравнения повреждающей способности гамма-лучей при различных температурах.

Таким образом, имеются предпосылки для выявления закономерностей влияния низкодозового гамма-излучения на спектральные характеристики фотолюминесценции обелина при различных температурах.

## Глава 2. Экспериментальная часть

### 2.1. Рабочие растворы и реактивы

Для приготовления рабочих растворов использовали следующие реактивы и препараты:

Рекомбинантный препарат обелина, полученные в лаборатории фотобиологии Института биофизики СО РАН: [Illarionov BA, Frank LA, Illarionova VA, Bondar VS, Vysotski ES, Blinks JR. Recombinant obelin: Cloning and expression of cDNA, purification, and characterization as a calcium indicator. Methods Enzymol Academic Press. 2000; 305:223–49.]

EDTA (этилен-бис-оксиэтиленнитрилтетра-уксусная кислота, C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>) (ч.д.а.) Sigma, Germany;

Трис (трис[гидроксиметил]аминометан) (ч.д.а.) Fluka, Switzerland;

CaCl<sub>2</sub> (ч.д.а.) Sigma, Germany;

Радиоактивная частица с <sup>137</sup>Cs с активностью 12 МБк.

Тритиевая вода (НТО) с активностью 200 МБк/л.

Из перечисленных реактивов готовили трис-HCl буфер (pH = 7): [трис] = 0,02 М и [ЭДТА] = 0,005 М. Концентрация обелина в кювете составила 10<sup>-5</sup> М. Разряженный обелин (представитель группы ЦЛМ-СФП) получали добавлением хлорида кальция к белковому раствору. Общая концентрация кальция составила 0,0047 М.

### 2.2. Схема эксперимента

В работе изучали влияние β-излучения и γ-излучения на раствор Ca<sup>2+</sup>-разряженного обелина в двух типах экспериментов:

(1) Ca<sup>2+</sup>-разряженный обелин получали путем добавления раствора хлорида кальция к раствору обелина, концентрация в кювете составила 0,005

М. Образцы ЦЛМ-СФБ подвергались воздействию источника гамма-излучения с мощностью дозы 2 мГр / ч в течении 16 дней при 5°C и 7 дней при 20°C, измерения проводили каждые 24 часа.

Параметры регистрации спектров испускания: диапазон длин волн 360-650 нм, фотовозбуждение 350 нм, скорость сканирования 600 нм/мин, размер щели 5 нм.

(2)  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный обелин получали путем добавления раствора хлорида кальция к раствору обелина, концентрация в кювете составила 0,005 М. Тритиевую воду к обелину добавляли непосредственно перед проведением биолуминесцентной реакции. Полученный  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженный обелин инкубировали с НТО с активностью 200 МБк/л в течение 6 дней при температуре 15°C.

### **2.3. Используемая аппаратура**

Спектры люминесценции регистрировались на люминесцентном спектрометре Carry Eclipse2000 ИБФ СО РАН. Для регистрации спектров применяли кварцевую кювету с прямоугольным сечением (2x10 мм).

Для регистрации флуоресценции при стационарном и импульсном возбуждении использовали спектрофлуориметр Fluorolog 3-22 (HoribaJobinYvon, США), оснащенный приставкой для измерения спада интенсивности флуоресценции методом счета фотонов с временной корреляцией. Стационарные спектры регистрировали при возбуждении ксеноновой лампой (длина волны 373 нм). Разрешенные во времени спады флуоресценции регистрировали при возбуждении импульсным диодом NanoLED с максимумом длины волны излучения 373 нм и длительностью импульса 1,2 нс. Спады интенсивности флуоресценции снимали в диапазоне 410–580 нм с шагом 5 нм, разрешение составляло 7 пс/канал. Времена жизни выделяли с помощью метода деконволюции, для восстановления формы возбуждающего сигнала использовали высококоллоидное соединение Ludox

(коллоидная окись кремния). Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Fluorolog 3 (HORIBA Jobin Yvon, США). В качестве источника возбуждения использована широкополосная ксеноновая лампа (450 Вт), которая излучает свет длиной волны от 240 нм до 850 нм для возбуждения образца. Размер щели – 2,5 нм. Для регистрации фотолюминесценции использовали кварцевую кювету прямоугольным сечением 2x10 мм.

## 2.4. Математическая обработка

(1) Математическую обработку полученных спектров проводили с помощью пакета Origin 9.1. Метод второй производной использовали для нахождения количества максимумов спектральных компонент и их положения. Разложение спектров фотолюминесценции на индивидуальные гауссовы контуры (компоненты) проводили в координатах интенсивность фотолюминесценции – волновое число.

Сравнивали площади расчетного суммарного спектра и экспериментально полученного; отклонение площади расчетного спектра от экспериментального оценивали величиной  $d$ , определяемой по следующей формуле:

$$d = \frac{|S_{\text{экс}} - S_{\text{расч}}|}{S_{\text{экс}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где  $S_{\text{экс}}$  - площадь экспериментального спектра;  $S_{\text{расч}}$  - площадь расчетного спектра, т.е. сумма площадей, выделенных компонент. Величина  $d$  для всех спектров не превышала 0,5 %.

Для оценки влияния радионуклидов на фотолюминесценцию обелина использовали величину относительного квантового выхода свечения  $Q^{\text{rel}}$ , которая определяется выражением:

$$Q^{\text{rel}} = \frac{Q_{\text{rad}}}{Q_{\text{contr}}}, \quad (2)$$

где  $Q_{\text{rad}}$  – относительный выход квантов фотолюминесценции радиоактивного раствора;  $Q_{\text{contr}}$  – относительный выход квантов фотолюминесценции контрольного раствора.

Относительные выходы квантов оценивали по суммарной площади спектральных компонент в спектрах фотолюминесценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина.

Статистический анализ проводили с помощью пакета Microsoft Office Excel 2013.

(2) Спектры флуоресценции были скорректированы с учетом эффекта внутреннего фильтра и фона растворителя. Наборы кривых спада флуоресценции каждого образца при регистрации в диапазоне 410–570 нм были проанализированы методами глобального анализа [57]. Качество описания оценивалось по статистическим критериям –  $\chi^2$ .

Спад интенсивности флуоресценции во времени описывали как сумму экспонент:

$$I(t) = \sum \alpha_i e^{\frac{-t}{\tau_i}}, \quad (3)$$

где  $\tau_i$  – время жизни,  $\alpha_i$  – амплитудный коэффициент  $i$ -й компоненты.

Вклад каждой временной компоненты в общее время жизни определяли с помощью следующего выражения:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (4)$$

Спектры, ассоциированные с временами жизни,  $I(\lambda, \tau_i)$ , рассчитывали по следующей формуле:

$$I(\lambda, \tau_i) = I_{ss}(\lambda) f_i(\lambda), \quad (5)$$

где  $I_{ss}(\lambda)$  – стационарный спектр флуоресценции,  $f_i(\lambda)$  – вклад  $i$ -й компоненты времени жизни на длине волны  $\lambda$ .

Анализ и обработку результатов проводили с применением прикладных программ Microsoft Excel и Microcal Origin Pro 8.1.



### **Глава 3.Результаты и обсуждения**

[Изъято 14 страниц]

## ВЫВОДЫ

По проделанной работе были сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что  $\gamma$ -излучение уменьшает выход квантов фотолюминесценции  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина на 20 % в течении 16 суток наблюдения при 5°C и на 80 % в течение 7 дней при 20°C .
2. Продемонстрировано, что воздействие цезия на фотолюминесценцию  $\text{Ca}^{2+}$ -разряженного обелина (  $\lambda_{\text{возб.}} = 350$  нм) приводит к увеличению вклада фиолетовой компоненты – протонированной формы целентерамида.
3. Влияние  $\gamma$ -излучения связано с деструктивным влиянием на белок и уменьшением эффективности переноса протона в электронно-возбужденном состоянии флуорофора разряженного обелина (целентерамида).
4. Выявлены три экспоненциальные компоненты в спаде флуоресценции  $\text{Ca}^{2+}$  -разряженного обелина с временами жизни 6,13 нс, 2,37 нс, 0,23 нс, которые характеризуются максимумами в интервалах 500-510 нм, 485-490 нм и 410-420 нм соответственно;
5. Показано, что тритий увеличивает вклад фиолетовой компоненты – протонированной формы целентерамида.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR)/ Sources and Effects of Ionizing Radiation. Annex C: Medical radiation exposures// United Nations. – New York. – 1993. – P. 249
2. Снигирева, Г.П. Цитогенетическое обследование профессионалов-атомщиков подвергавшихся хроническому воздействию бета-излучения трития/ Г.П. Снигирева, Т.И. Хаймович, А.Н. Богомазова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2009. – Т.49, № 1. – С.60-67
3. Kobzeva, T.V. Stimulation of luminescence of mycelium of luminous fungus *Neonothopanus nambibii* by ionizing radiation. / T.V. Kobzeva, A.R. Melnikov, T.Y. Karogodina, S.B. Zikirin, D.V. Stass, Y.N. Molin, E.K. Rodicheva, S.E. Medvedeva, A.P. Puzyr, A.A. Burov, V.S. Bondar, J.I. Gitelson, // Luminescence. – 2014. – № 29. – С. 703-710
4. Rozhko, T.V. On mechanism of biological activation by tritium / T.V. Rozhko, G.A. Badun, I.A. Razzhivina, O.A. Guseynov, V.E. Guseynova, N.S. Kudryasheva // J. Environ. Radioact. – 2016. – № 157. – С.131–135.
5. Kudryasheva, N.S. Effect of low-dose ionizing radiation on luminous marine bacteria: radiation hormesis and toxicity. (Review) / N.S. Kudryasheva, T.V. Rozhko // J. Environ. Radioact. – 2015. – V. 142. – P.68-77
6. Alexandrova, M. Effect of americium-241 on luminous bacteria. Role of peroxides / M. Alexandrova, T. Rozhko, G. Vydryakova, N. Kudryasheva // J. Environ. Radioact. – 2011. – V.102. – P. 407-411

7. Berovic, N. An investigation of the reaction kinetics of luciferase and the effect of ionizing radiation on the reaction rate / N. Berovic, D.J. Parker, M.D. Smith // Eur. Biophys. J. – 2008. – №38(4). – С. 427-435
8. Rozhko, T.V. Effect of low-level  $\alpha$ -radiation on bioluminescent assay systems of various complexity / T.V. Rozhko, N.S. Kudryasheva A.M. Kuznetsov, G.A. Vydryakova, L.G. Bondareva, A.Y. Bolsunovsky // Photoch. Photobiol. Sci. – 2007. – №6. – P. 67-70
9. Selivanova, Effect of tritium on luminous marine bacteria and enzyme reactions / M.A. Selivanova, O.A. Mogilnaya, G.A. Badun, G.A. Vydryakova, A.M. Kuznetsov, N.S. Kudryasheva // J. Environ. Radioactiv. – 2013. – № 120. – P. 19-25
10. Высоцкий, Е.С. Кальций-регулируемые фотопротеины морских кишечнорастворимых / Е.С. Высоцкий, С.В. Маркова, Л.А. Франк // Журн. Молекулярная биология. – 2006. – Т 40, № 3. – С. 404 – 416.
11. Alieva, R.R. Effects of alcohols on fluorescence intensity and color of a discharged-obelin-based biomarker / Roza R. Alieva, Nadezhda V. Belogurova, Alena S. Petrova, Nadezhda S. Kudryasheva//Analytical and Bioanalytical Chemistry – 2014. – V. 406. – № 12. – P. 2965–2974.
12. Belogurova N.V., Kudryasheva N.S. Discharged photoprotein obelin: fluorescence peculiarities // J.Photochem. Photobiol.B, – 2010, – V.101, – P.103–108.
13. Bolsunovsky A.Ya., Tcherkezian V.O. Hot particles of the Yenisei River flood plain// Russia. J Environ Radioact – 2001 – V. 57 – P. 167–174.
14. Bolsunovsky A.Ya., Unique diversity of radioactive particles found in the Yenisei River floodplain / Bolsunovsky A, Melgunov M, Chuguevskii A, Lind OC, Salbu B// Scientific Reports – 2017 – V. 7 – P. 1–10.
15. Shimomura, O. Partial purification and properties of the *Chaetopterus* luminescence system / O. Shimomura, F.H. Johnson // Bioluminescence in progress. – Princeton. – 1966. – P.495 – 521.

16. Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods / Shimomura O. // Singapore: World Scientific Publishing Co. – 2006. – p. 470.
17. Liu, Z.J. Structure of the  $\text{Ca}^{2+}$ - regulated photoprotein obelin at 1.7 Å resolution determined directly from its sulfur substructure / Z.J. Liu, E.S. Vysotski, C.J. Chen, J.P. Rose, J. Lee, B.C. Wang // J. Protein Science, 2000. – V. 9, N 11. – P.2085-2093.
18. Teranishi, K. Luminescence of imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one compounds / K. Teranishi // J. Bioorganic Chemistry. – 2007. – V. 35. – P. 82 – 111.
19. Liu, Z. J. Crystal structure of obelin after  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state / Z. J. Liu, G.A. Stepanyuk, E.S. Vysotski, J. Lee, S.V. Markova, N.P. Malikova, B.C. Wang // PNAS. – 2006. - № 103. – P. 2570–2575.
20. Shimomura, O. Calcium binding, quantum yield, and emitting molecule in aequorin bioluminescence / O. Shimomura, F.H. Johnson // Nature. – 1970. – V. 227. – P. 1356 – 1357.
21. Илларионов, Б.А. Клонирование и экспрессия кДНК кальций-активируемого фотопротейна из гидроидного полипа *Obelialongissima* / Б.А. Илларионов, С.В. Маркова, В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, И.И. Гительзон // ДАН. – 1995. – Т. 326, № 5. – С. 911-913.
22. Illarionov, B.A. Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA, purification, and characterization as a calcium indicator / B.A. Illarionov, L.A. Frank, V.A. Illarionova, V.S. Bondar, E.S. Vysotski, J.R. Blinks // J. Methods in enzymology. – 2000. – №. 277. – P. 223–249.
23. Бондарь, В.С. Физико-химические свойства фотопротейна из гидроидного полипа *Obelialongissima* / В.С. Бондарь, К.П. Трофимов, Е.С. Высоцкий // Журн. Биохимия. – 1992. – 57. – С.1020 – 1027.

24. Shimomura, O. Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine / O. Shimomura, K. Teranishi // J. Luminescence. – 2000. – № 15. – P.51–58.
25. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина. – 1998. – 704 с.
26. Alieva, R. R. Ultraviolet fluorescence of coelenteramide and coelenteramidecontaining fluorescent proteins. Experimental and theoretical study / R. R. Alieva, F. N. Tomilin, A. A. Kuzubov, S. G. Ovchinnikov, N. S. Kudryasheva // Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology. – 2016. – V. 162. – P. 318-323.
27. McCapra, F. The chemiluminescence of Cypridina analogue / F. McCapra, Y. C. Chang // Chem. Commun. – 1967. – P. 1011-1012. 46.
28. Hori, K. Chemiluminescence of Renilla (sea pansy) luciferin and its analogues /K. Hori, J. E. Wampler, M. J. Cormier // J. Chem. Commun. – 1973. – P. 492-494.
29. Saito, R. Solvent and substituent effects on the fluorescent properties of coelenteramide analogues / R. Saito, T. Hirano, H. Niwa, M. Ohashi // Journal of the chemical society, Perkin transactions 2. – 1997. – P. 1711-1716.
30. Liu, Z. J. Crystal structure of obelin after Ca<sup>2+</sup>-triggered bioluminescence suggests neutral coelenteramide as the primary excited state / Z. J. Liu, G. A. Stepanyuk, E. S. Vysotski, J. Lee, S. V. Markova, N. P. Malikova, B. C. Wang // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – V. 103. – P. 2570-2575.
31. Vysotski, E. S. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: structural insight into the bioluminescence mechanism / E. S. Vysotski, J. Lee // Acc. Chem. Res. – 2004. – V. 37. – P. 405-415.
32. Tomilin, F. N. Fluorescence of calcium-discharged obelin: The structure and molecular mechanism of emitter formation / F. N. Tomilin, L. U. Antipina, E. S. Vysotski, S. G. Ovchinnikov, I. I. Gitelzon // Dokl. Biochem. Biophys. – 2008. – V. 422. – P. 279-284

33. Антипина, Л. Ю. Теоретическое моделирование процесса флуоресценции и формирование излучающего субстрата белка обелина / Л. Ю. Антипина, С. Г. Овчинников // В мире научных открытий, Физико-математические науки. – 2010. – № 5 (11). – С. 35-37.
34. Laptanok S. P. et al. Disentangling picosecond events that complicate the quantitative use of the calcium sensor YC3. 60 //The Journal of Physical Chemistry B. – 2012. – Т. 116. – №. 9. – С. 3013-3020.
35. Кривошеин, Д.А Экология и безопасность жизнедеятельности / Д.А. Кривошеин, Л.А. Муравей, О.С. Шорина // учебное пособие для вузов. М.: Юнити- Дана. – 2000. – 447 с.
36. Кривошеин, Д.А Экология и безопасность жизнедеятельности / Д.А. Кривошеин, Л.А. Муравей, О.С. Шорина // учебное пособие для вузов. М.: Юнити- Дана. – 2000. – 447 с.
37. Кудряшов, Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения) // М.: Физматлит. – 2004. 446 с.
38. Ленский, Л.А. Физика и химия трития. // М.: Энергоиздат. – 1981. – 112 с.
39. Эванс, Э. Тритий и его соединения // М.: Атомиздат. – 1970. – 311 с.
40. Tucker D. Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: A review of the major considerations for human biological dosimetry // Mutation Research. – 2008. – V.659. – P.211-220.
41. Щепина, Н. Е. Реакция прямого фенилирования нуклеогенными катионами как метод синтеза неизвестных и труднодоступных соединений, меченных тритием/ Н. Е. Щепина, В. В. Аврорин, Г. А. Бадун и др // Вестник Моск. ун-та. Сер.2. – 2009. – Т. 50, № 5. – С. 311-316.
42. Galeriu, D., Melintescu, A. Tritium: radionuclide. // Encyclopedia of inorganic chemistry. – 2006.

43. Корогодин, В.И. Принципы оценки радиационной опасности.// Природа. – 1990. – №8. – С.34-38.
44. Гераськин С.А. Концепция биологического действия малых доз ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т.35, № 5. – С.571-580.
45. Calabrese, E.J. The frequency of U-shaped dose responses in the toxicological literature/ Calabrese E.J., Baldwin L.A. // Toxicol. Sci. – 2001. – V.62. – P. 330 338.
46. Kaiser J. Hormesis: Sipping From a Poisoned Chalice // Science. – 2003. – V. 302. – P.376-379.
47. Heinz, G.H. Enhanced Reproduction in Mallards Fed a Low Level of Methylmercury: An Apparent Case of Hormesis/ D.J. Hoffman, J.D. Klimstra, K.R. Stebbins // Environ. Toxicol. Chem. – 2010. – V. 29. – P.650-653.
48. Planel H. Test of experimental demonstration of the biological activity of natural ionizing radiations/ H. Planel, J.P. Soleilhavoup, D. Blane et al // C. R. Acad. Sci. – 1966. – V.262. – P.2767-2770.
49. Кузин А.М. Электромагнитная информация в явлении жизни // Биофизика. – 2000. – Т.45, Вып. 1. – С.144-147.
50. Min, V.J. Gamma-radiation dose-rate effects on DNA damage and toxicity in bacterial cells/ V.J. Min, C.W. Lee, M.B. Gu, // Radiat. Environ. Bioph. – 2003. – 42. – P.189-192
51. Rozhko, T.V Detoxification of AM-241 Solutions by Humic Substances: Bioluminescent Monitoring / T.V Rozhko, L.G. Bondareva, O.A. Mogilnaya, G.A. Vydryakova, A.Ya. Bolsunovsky, D.I. Stom, N.S. Kudryasheva // Anal. Bioanal. Chem. – 2011, – № 400 (2), –P. 329-330
52. Selivanova, M.A. Comparison of chronic low-dose effects of alpha and beta-emitting radionuclides on marine bacteria / M.A. Selivanova, T.V. Rozhko, A.N. Devyatlovskaya, N.S. Kudryasheva //Central European Journal of Biology . – 2014



53. Rozhko T.V., Is bacterial luminescence response to low-dose radiation associated with mutagenicity / Rozhko T.V., Guseynov O.A., Bondar A.A., Guseynova V.E., Devyatlovskaya A.N., Kudryasheva N.S.// J Environ Radioact – 2017 – V. 177 – P. 261-265
54. Min J., Gamma-radiation dose-rate effects on DNA damage and toxicity in bacterial cells / Min J, Lee CW, Gu MB// Radiat Environ Biophys – 2003 – V. 42 – P. 189–92. doi: 10.1007/s00411-003-0205-8
55. Kudryasheva N.S., Exposure of luminous marine bacteria to low-dose gamma radiation / Kudryasheva N.S., Petrova A.S., Dementyev D.V., Bondar A.A.// Journal of Environ Radioactivity – 2017 – V. 170 – P. 64-69.
56. Bolsunovsky A., Low doses of gamma-radiation induce SOS response and increase mutation frequency in Escherichia coli and Salmonella typhimurium cells / Bolsunovsky A, Frolova T, Dementyev D, Sinitsyna O. // Ecotoxicol Environ Saf. – 2016 – V. 134 – P. 233–8
57. Knutson, J. R. Simultaneous analysis of multiple fluorescence decay curves: a global approach / J. R. Knutson, J. M. Beechem, L. Brand // Chemical physics letters. – 1983. – T. 102. – №. 6. – C. 501-507.
58. Mina, C.The fluorescent properties of coelenteramide, a substrate of aequorin and obelin / C. Mina, Z. Li, A.Rena, L.Zou, J.Guoc, J.D. Goddard // Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2013. – V. 251. – P. 182–188.
59. Chen, S.F.QM/MM Study on the Light Emitters of Aequorin Chemiluminescence, Bioluminescence, and Fluorescence: A General Understanding of the Bioluminescence of Several Marine Organisms / S.F.Chen, N. Ferre, Y.J. Liu // European Journal A: Chemistry A. – 2013. – V. 19. – P. 8466–8472.
60. Chen, S.F.Chemiluminescence of Coelenterazine and Fluorescence of Coelenteramide: A Systematic Theoretical Study / S.F.Chen, I.Navizet,

- D.Roca-Sanjua, R.Lindh, Y.J.Liu, N.Ferré // J. Chem. Theory Comput. – 2012. – V. 8. – P. 2796–2807.
61. Alieva R.R., Kudryasheva N.S., Variability of fluorescence spectra of coelenteramide-containing proteins as a basis for toxicity monitoring // Talanta – 2017 – V. 170 – P. 425-431
62. Petrova AS, Lukonina AA, Badun GA, Kudryasheva NS. Fluorescent Coelenteramide-Containing Protein as a Color Bioindicator for Low-Dose Radiation Effects. Anal Bioanal Chem. 2017; 409:4377–4381. doi: 10.1007/s00216-017-0404-9

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

*В.А. Крайнов* *Крайнов В.А.*

подпись инициалы, фамилия

« 14 » 06 20 18 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние низкоинтенсивного радиационного излучения на спектрально-  
люминесцентные свойства разряженного фотопротейна обелина

03.04.02 Физика

03.04.02.01 Биофизика

Научный руководитель

в.н.с., д.ф.-м.н.

Н.С. Кудряшева

Выпускник

подпись, дата

А.А. Луконина

Рецензент

подпись, дата

с.н.с., к.б.н.

Т.В. Рожко

подпись, дата

Красноярск 2018